

Nota técnica

**CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES Y SEMILLAS DE CEDRO
(*Cedrela odorata* L.) MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE VITRIFICACIÓN
Y DESHIDRATACIÓN**Tatiana García Rojas*, Ana Abdelnour Esquivel^{1/*}**Palabras clave:** Criopreservación, nitrógeno líquido, vitrificación, cultivo in vitro, reguladores de crecimiento, ápices, semillas, cedro, *Cedrela odorata*.**Keywords:** Cryopreservation, liquid nitrogen, vitrification, in vitro culture, growth regulators, shoots, seeds, cedar, *Cedrela odorata*.

Recibido: 31/08/12

Aceptado: 04/03/13

RESUMEN

En busca de proteger el recurso forestal de *Cedrela odorata* L., actualmente amenazado, se planteó la necesidad de establecer un protocolo para su criopreservación; la investigación se realizó con ápices y semillas. Con los ápices se evaluó la técnica de vitrificación a través de varias soluciones vitrificadoras y congelamiento rápido en nitrógeno líquido (NL). Inicialmente los mejores resultados se obtuvieron al evaluar la incubación en la solución PVS3 por 5 min antes del congelamiento, con una sobrevivencia del 61% después de 3 semanas de cultivo en el medio Murashige y Skoog (MS) con 1,0 mg.l⁻¹ BAP y 0,1 mg.l⁻¹ AG₃. Por otra parte, al incubar los ápices en una solución 0,3 M de sacarosa por 5 min previo al congelamiento, el porcentaje de sobrevivencia alcanzó 86% después de 2 semanas de cultivo en un medio MS con 1,0 mg.l⁻¹ BAP, 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ y 0,01 mg.l⁻¹ AIA. Cuando se utilizó la incubación en la solución de 0,3 M sacarosa y el medio de recuperación MS con 1 mg.l⁻¹ KIN, 0,5 mg.l⁻¹ AG₃ y 100 mg.l⁻¹ carbón activado, la apariencia de los ápices sobrevivientes mejoró considerablemente. Para la criopreservación de semillas de cedro, se evaluó el método de deshidratación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido (NL). Semillas con un contenido de

ABSTRACT

Cryopreservation of shoots and seeds of cedar (*Cedrela odorata* L.). In order to protect the forest resources of *Cedrela odorata* L., currently threatened, it was considered necessary to establish a protocol for its cryopreservation. Research was conducted using shoots and seeds. Vitrification techniques were evaluated with shoots, using various solutions and rapid freezing in liquid nitrogen (LN). Initially the best results were obtained using incubation for 5 min in PVS3 solution before freezing, survival being 61% after 3 weeks of culture on Murashige and Skoog (MS) medium with 1.0 mg.l⁻¹ BAP and 0.1 mg.l⁻¹ GA₃. Moreover, by incubating the apices in 0.3 M sucrose solution for 5 min prior to freezing, the survival rate reached 86% after 2 weeks of culture on MS medium with 1.0 mg.l⁻¹ BAP, 0.1 mg.l⁻¹ GA₃ and 0.01 mg.l⁻¹ IAA. When incubation in the solution of 0.3 M sucrose was used and recovery MS medium with 1 mg.l⁻¹ KIN, 0.5 mg.l⁻¹ GA₃ and 100 mg.l⁻¹ activated charcoal, the appearance of the surviving shoots improved significantly. For cryopreservation of cedar seeds, the methodology of dehydration and rapid freezing in liquid nitrogen (LN) was evaluated. Seeds with moisture content between 7.9% and 5.5% were placed in 5 ml polypropylene

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: aabdelnour@itcr.ac.cr

* Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

humedad entre 7,9% y 5,5% fueron colocadas en criotubos de polipropileno de 5 ml y los criotubos sumergidos directamente en NL. Se evaluó el efecto del periodo de almacenamiento en NL (1 h, 24 h, 7 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses) sobre la germinación de las semillas. No se presentaron diferencias significativas en su capacidad de germinación después de permanecer en los diferentes periodos de almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

El germoplasma vegetal constituye uno de los recursos naturales más importantes y posee un valor incalculable para la humanidad (Poehlmann 2005). Durante la segunda mitad del siglo XX, la necesidad de conservar los bosques de las regiones tropicales se volvió cada vez más evidente. En los neotrópicos ha habido, y hasta hoy existen, extensos recursos forestales, pero cada vez están en mayor peligro por el abuso, la deforestación irracional y el mal manejo. La acelerada deforestación de los bosques naturales ha llevado a la disminución de individuos que en muchos casos eran catalogados como excelentes árboles reproductores (Wadsworth 2000); por lo que esfuerzos para prevenir la erosión genética se han dirigido a conservar las diferentes especies de interés, al tratar de complementar la conservación *in situ* con otros métodos de conservación *ex situ* como los bancos de semillas, las colecciones de campo y las colecciones *in vitro* (Engelmann 2011). Dentro de esta última modalidad, la crioconservación se presenta como una nueva alternativa que permite almacenar bajo condiciones de alta estabilidad genética estos importantes recursos (García et ál. 2007). La crioconservación consiste en el almacenamiento de células vivas y organismos a ultra bajas temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido (NL) (Engelmann 2011), para la estabilidad genética del germoplasma en las colecciones (Benson et ál. 2006). A esta

vials and these were directly immersed in NL. The effect of the storage period in NL (1 h, 24 h, 7 days, 1 month, 3 months and 6 months) on seed germination was evaluated. There were no statistical differences in ability of seeds to germinate after storage during different periods.

temperatura, las divisiones celulares y los procesos metabólicos se encuentran detenidos, por lo que el material vegetal puede ser almacenado sin alteración por un periodo de tiempo teóricamente ilimitado (González y Engelmann 2006). La crioconservación es especialmente recomendada para la conservación de los recursos fitogenéticos de especies recalcitrantes, sensibles a la desecación, cuyo potencial para ser conservadas se ve limitado al utilizar otras modalidades (Martínez et ál. 2003); así como en especies en peligro de extinción que debido a su escasez o por algún factor particular de su biología, se encuentran gravemente amenazadas de desaparecer (Abdelnour et ál. 2007). También es especialmente útil para la conservación de materiales generados en laboratorio como ápices, meristemos, líneas celulares y callos y para la conservación de germoplasma en general (Dolce et ál. 2004). Dentro de las técnicas de crioconservación se reconocen varios procedimientos, uno de los más utilizados es la vitrificación *per se* (Engelmann 2000). El principio del método es deshidratar el explante exponiéndolo a una solución vitrificadora con alto potencial osmótico por unos cuantos minutos previo al congelamiento (Sánchez y Jiménez 2010, Wang y Deng 2004). Usualmente se utilizan soluciones vitrificadoras a base de glicerol y las más conocidas son PVS2, PVS3 y PVS4 (Sakai y Engelmann 2007). La solución se súper enfría por debajo de temperaturas menores a los

-100°C y finalmente se solidifica en un vidrio metaestable a la temperatura de transición del vidrio (Sakai y Engelmann 2007).

Por otra parte, para el almacenamiento de semillas ortodoxas, la conservación *ex situ* se realiza principalmente en bancos convencionales de semillas y si se mantienen con un bajo contenido en humedad, a bajas temperaturas, teóricamente, el periodo de conservación se incrementa. Sin embargo, aún en las mejores condiciones de almacenamiento, las semillas sufren una progresiva pérdida de viabilidad, adicionalmente, estas semillas pueden ser almacenadas mediante técnicas de crioconservación, como un respaldo de las colecciones existentes (Cardoso et ál. 2000). En cuanto al cedro (*Cedrela odorata* L. Meliaceae), conocido como cedro amargo, si sus semillas se conservan en condiciones ambientales, su viabilidad disminuye rápidamente después de un mes, pero almacenadas adecuadamente se conservan por varios meses. Las semillas almacenadas en bolsas de polietileno a 5°C de temperatura y 7% de contenido de humedad, mantienen un porcentaje de germinación de 50 a 60%, a los 2 años. Por su resistencia al almacenamiento se considera una especie ortodoxa. La semilla se conserva bien por lo menos 9 meses a una temperatura de 2 a 3°C, esté o no herméticamente envasada. El mejor registro de almacenamiento muestra el 86% de viabilidad de las semillas después de 304 días de estar almacenadas a 2°C de temperatura y 4% de contenido de humedad (Díaz et ál. 2010). *Cedrela* y sus demás especies se considera una de las maderas comerciales más preciosas e importantes de América Latina, en especial *Cedrela odorata* (Díaz et ál. 2010). Esto ha ocasionado que esté sometida a grandes presiones por su extracción. Uno de los mayores problemas del cedro es el taladrador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* Zeller; cuyo ataque se intensifica en los árboles que crecen en plantaciones comerciales. Estas razones evidencian la necesidad de evaluar y establecer métodos para preservar el material valioso remanente de cedro (Díaz et ál. 2010, Howard y Merida 2004, Navarro 2002). Todo material de estas especies, generado en

laboratorio, debe conservarse de manera segura y por periodos extensos y la crioconservación representa un respaldo a futuro de este valioso germoplasma.

El presente estudio pretendió establecer protocolos para la crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante la técnica de vitrificación en ápices, la deshidratación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido en las semillas. También se evaluó el efecto del periodo de almacenamiento a ultra baja temperatura sobre la germinación de las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento *in vitro* del material vegetal

Para los primeros ensayos de establecimiento *in vitro* y crioconservación, las semillas fueron colectadas del árbol, en marzo del 2008, de árboles identificados como élite (Santa Cruz, Guanacaste, Costa Rica) y el procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* consistió en el lavado de las semillas con detergente (Bactex®) seguido de 3 enjuagues con agua estéril, luego de la incubación en una solución de NaOCl al 3,5% i.a., por 10, 15 y 20 min y por último, las semillas fueron enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril y cultivadas en el medio MS (Murashige y Skoog 1962) con 0,5 mg.l⁻¹ de benciladenina (BA).

Los siguientes ensayos para el establecimiento *in vitro* y crioconservación de semillas se hicieron con semillas proporcionadas por el Banco de Semillas Forestales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (BSF-CATIE). Las semillas venían en empaques sellados y habían recibido un tratamiento de desecación previo, para permitir su almacenamiento a temperaturas cercanas a los 4°C. Según el certificado otorgado por el BSF-CATIE el porcentaje de humedad de las semillas era de 5,5%. Se evaluaron 2 lotes, el primero fue CATIE 058/08J (colectadas del árbol en el primer trimestre de 2008), con una pureza de 95% y un porcentaje de germinación de 92%. El segundo

lote CATIE 058/09K (colectadas del árbol en el 2009) también presentó un porcentaje de pureza del 95% pero un porcentaje de germinación de 60%. Ambos lotes de semillas procedentes de Pococí, Limón, Costa Rica; de una fuente identificada de un bosque natural. Las semillas se pre-seleccionaron, aquellas que para las pruebas, presentaban una coloración café clara o parda. Se descartaron las semillas café oscuro y negras, ya que en ensayos preliminares se determinó que estas habían perdido su capacidad de germinación. Para el establecimiento *in vitro* se siguió el procedimiento de desinfección descrito arriba, previa incubación en una solución de Agri-mycin®, Benlate®, Ferbam® en una concentración de 5 g.l⁻¹ de cada uno por 30 min, seguido de 15 min en la solución de NaClO al 3,5% i.a. La inducción de la germinación se realizó en el medio MS (Murashige y Skoog 1962) enriquecido con 0,5 mg.l⁻¹ BAP. Para su multiplicación (cerca de 5 semanas después de la introducción), cuando las plántulas presentaban varios nudos, se segmentaron en microestacas de 1 a 2 nudos y se cultivaron en el medio MS con 0,5 g.l⁻¹ caseína hidrolizada y 1 mg.l⁻¹ de BA.

Crioconservación de ápices

Para iniciar los ensayos de crioconservación, las plantas germinadas y desarrolladas *in vitro* fueron multiplicadas. Una semana después de la multiplicación, los ápices axilares fueron disecados y sometidos a diferentes tratamientos del proceso de pre y post congelamiento en NL. Para evaluar la regeneración (recuperación) de los ápices se empleó el medio MS mediante modificación de las concentraciones de reguladores del crecimiento en el transcurso de las pruebas, con el fin de optimizar los resultados. Inicialmente se empleó un MS con 0,5 mg.l⁻¹ de BAP. En las siguientes pruebas se evaluó el BAP en concentraciones de 0, 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg.l⁻¹; con la colocación de papel filtro (Whatman #100) sobre la superficie del medio sólido, para facilitar la manipulación de los explantes. A partir de estos ensayos se continuó con el medio MS de 1,0 mg.l⁻¹ BAP como medio base de recuperación de los ápices y a este se

adicionaron otros reguladores como AG₃ (ácido giberélico) (0,1 mg.l⁻¹) y AIA (ácido indolacético) (0,01 mg.l⁻¹). Los ápices en medio de regeneración se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad la primera semana, luego fueron transferidos una semana a luz difusa y posteriormente en luz directa. Las condiciones de crecimiento fueron de 25°C ± 2 y un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 3000 lux. Se consideraron como sobrevivientes los ápices que permanecieron verdes y los que regeneraron con nuevas hojas.

Durante la etapa de pretratamiento (acondicionamiento para el proceso congelación), los ápices aislados fueron precultivados por 24 h, en el medio de cultivo MS con sacarosa, sola o en combinación con glicerol (0,3 M sacarosa, 0,3 M sacarosa + 1 M glicerol, 0,5 M sacarosa, 0,5 M sacarosa + 1 M glicerol). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad para evitar su oxidación, a una temperatura de 20°C ± 2 durante las 24 h; posteriormente los ápices fueron transferidos al medio de regeneración para evaluar así el efecto del precultivo en la recuperación y elegir el mejor proceso a utilizar en etapas posteriores.

Una vez conocidas las mejores condiciones de pretratamiento, se procedió a realizar el protocolo de vitrificación y el congelamiento en NL (Sakai y Engelmann 2007). En criotubos de polipropileno de 1,2 ml, los ápices provenientes del precultivo fueron incubados en 1 ml de la solución de carga (LS, MS + 0,4 M sacarosa + 2 M glicerol); después de 20 min, la solución fue reemplazada por la solución vitrificadora a evaluar: PVS2 (MS + 0,4 M sacarosa + 30% v/v glicerol + 15% v/v etilenglicol + 15% v/v DMSO [dimetil sulfóxido]), PVS3 (MS + 50% v/v glicerol + 50% m/v sacarosa) y PVS4 (MS + 0,6 M sacarosa + 35% v/v glicerol + 20% v/v etilenglicol), todas durante periodos de 5 y 10 min. Pasado el periodo de incubación, los crioviales con los ápices y la solución vitrificadora fueron introducidos rápidamente en NL donde permanecieron cerca de 17 h. Se descongelaron en un baño de agua a 40°C durante 2 min e inmediatamente se eliminó la solución vitrificadora y se

adicionó 1 ml de la solución de lavado (MS +1,2 M sacarosa) por 5 min. Para su recuperación, los ápices fueron cultivados en el medio de regeneración (MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃, con papel filtro) bajo las condiciones ya señaladas.

Adicionalmente se realizaron ensayos mediante la incubación antes del congelamiento rápido en NL, en 4 soluciones diferentes para la crioconservación: MS + 0,3 M sacarosa, MS + 0,3 M sacarosa + 5% v/v DMSO, MS + 0,4 M sacarosa y MS +0,4 M sacarosa + 5% v/v DMSO; ápices incubados por 5 y 10 min. El medio de precultivo empleado en cada caso tuvo la misma composición de la solución líquida, pero en estado sólido; así, por ejemplo, cuando se precultivaron en el MS (sólido) + 0,3 M sacarosa, la solución empleada también fue un MS (líquido) + 0,3 M sacarosa. Dicho tratamiento fue el empleado para el proceso de congelamiento. El medio de regeneración en estos últimos ensayos fue MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ + 0,01 mg.l⁻¹ AIA, con papel filtro sobre la superficie del medio de cultivo.

Finalmente, la investigación se direccionó a evaluar la crioconservación por medio de la solución MS + 0,3 M sacarosa y diferentes medios de regeneración, enriquecidos con diversos reguladores de crecimiento y su combinación (BAP: bencialaminopurina, KIN: kinetina, TDZ: tidiazuron, AG₃ ácido giberélico) así como la adición de otros compuestos como carbón activado. Una vez seleccionados los medios que permitieron la mayor sobrevivencia y regeneración de los ápices congelados M1 (MS + 1 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ + 0,01 mg.l⁻¹ AIA + 100 mg.l⁻¹ carbón activado) y M2 (MS + 1 mg.l⁻¹ KIN + 0,5 mg.l⁻¹ AG₃ + 100 mg.l⁻¹ carbón activado), pasado el periodo de almacenamiento en NL, los ápices se transfirieron cada día o cada 2 días a medio fresco en oscuridad y una semana después a luz directa.

En todos los tratamientos se establecieron 2 o 3 repeticiones de 15 ápices cada una. Las evaluaciones de las pruebas se realizaron cada semana, durante un número de semanas variable. En todos los casos, se anotó el número

de ápices sobrevivientes así como el número de ápices regenerados del total de sobrevivientes. Estos resultados fueron sometidos al análisis de varianza y prueba de significación Tukey con un nivel de significancia de 0,05 cuando se determinó la existencia de diferencias significativas con el ANOVA. Además de los resultados cuantitativos se consideraron también las características cualitativas o morfológicas de los ápices (color y apariencia general de los ápices).

Crioconservación de semillas

Para los ensayos iniciales de crioconservación, se determinó el contenido de humedad de las semillas (coloración café clara o parda), con base en el peso fresco y seco (ISTA 2008). Grupos de 50 semillas, de cada periodo de deshidratación evaluado (0 a 5 h en el flujo de aire de la cámara de transferencia de flujo laminar), fueron colocadas en criotubos de polipropileno de 5 ml y congeladas rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido, donde permanecieron una hora. Luego, las muestras fueron descongeladas por inmersión de los criotubos en un baño de agua a 40°C por 2 min (Abdelnour et ál. 2007) y cultivadas en el medio de cultivo MS con 0,5 mg.l⁻¹ de BA para su recuperación. Para estos ensayos iniciales de crioconservación, se evaluó la desinfección de las semillas antes y después del congelamiento en NL, éste último para evitar la rehidratación de la semilla antes del congelamiento.

Adicionalmente, se determinó la sobrevivencia y germinación de semillas de cedro después de ser almacenadas por varios periodos en NL (1 h, 24 h, 1 semana, 1 mes, 3 meses y 6 meses). El material experimental para estas pruebas se obtuvo del Banco de Semillas Forestales de CATIE (BSF-CATIE). Las semillas venían en empaques sellados y habían recibido un tratamiento de desecación previo, para permitir su almacenamiento a temperaturas cercanas a los 4°C. Según el certificado otorgado por el BSF-CATIE el porcentaje de humedad de las semillas era de 5,5%. Para estos ensayos, las semillas fueron colocadas en crioviales (tubos de polipropileno de 5 ml), en grupos de 30 semillas por criovial

e inmediatamente fueron congeladas por inmersión en un tanque de almacenamiento con NL. Para cada tratamiento se hicieron 3 repeticiones. Una vez concluido cada uno de estos periodos de almacenamiento, se extrajeron los crioviales con las semillas e inmediatamente se introdujeron en un baño de agua a 40°C por 2 min para su descongelación. Posteriormente, se procedió a realizar el procedimiento de desinfección de las semillas, a partir del protocolo descrito previamente en la sección de establecimiento in vitro del material vegetal. De igual forma se siguieron las demás especificaciones del proceso de introducción de las semillas.

RESULTADOS

Establecimiento in vitro del material vegetal

El porcentaje de germinación in vitro de las semillas alcanzó el 100%, después de 2 semanas de cultivo (indistinto del origen y siempre que se seleccionaron las semillas), tanto en el medio MS con 0,5 mg.l⁻¹ de BA como en ausencia de BA. La desinfección con NaOCl al 3,5% i.a., durante 15 min permitió el establecimiento aséptico del material (97%). Por otra parte, aquellas semillas cultivadas en el medio MS simple mostraron crecimiento vigoroso y desarrollo de raíces y mejor aspecto general que aquellas cultivadas en la presencia de BA (0,5 mg.l⁻¹) en el medio de cultivo (Datos no se muestran). En la etapa de multiplicación, cuando el medio de cultivo se enriqueció con 0,5 g.l⁻¹ de caseína hidrolizada como fuente adicional de nitrógeno, se observó el desarrollo de plántulas con un buen sistema radicular y un aspecto general saludable, hojas grandes y verdes. Cuando a este medio se adicionó BA (1,0 a 2,0 mg.l⁻¹) para estimular la brotación de las yemas axilares y facilitar la disección de los ápices, se observó caída de hojas y hiperhidricidad en los tejidos. Resultados similares se observaron durante la regeneración de los ápices disectados cuando se utilizó este mismo medio de cultivo. Aunque durante la primera semana la sobrevivencia en este medio fue buena, conforme pasaron

los días este porcentaje disminuyó y los ápices que lograron regenerar murieron al poco tiempo (Datos no se muestran).

Crioconservación de ápices

Cuando se trató de mejorar los índices de sobrevivencia y regeneración de los ápices para iniciar los ensayos de crioconservación, de los 5 tratamientos evaluados (MS, MS + 0,5 mg.l⁻¹ BAP, MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP, MS + 1,5 mg.l⁻¹ BAP y MS + 2,0 mg.l⁻¹ BAP, cada uno con y sin papel filtro), los mayores porcentajes de sobrevivencia y regeneración se obtuvieron cuando se colocó papel filtro sobre la superficie del medio sólido. Dentro de este grupo, los mayores porcentajes de sobrevivencia fueron observados en el MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP, con 100% de sobrevivencia en la semana 1, y fue el tratamiento que, a lo largo de las 5 semanas de evaluación mantuvo los porcentajes más altos de sobrevivencia (83% y 73% a la tercera y quinta semana de cultivo respectivamente), además, la apariencia de los ápices fue la mejor (verdes y sin hiperhidratación). En todos los medios evaluados, durante la semana 1 ya se notaban indicios de regeneración y para la semana 5 la mayoría de los ápices sobrevivientes presentaron entre 2 y 4 hojas. Para los medios sin papel, aunque hubo sobrevivencia y también regeneración, el número de hojas no superó las 2 por ápice. En los medios de cultivo con concentraciones de BAP mayores a 1 mg.l⁻¹, los ápices presentaron apariencia vidriosa y coloración amarillenta, lo que también fue observado frecuentemente en los medios sin papel filtro, aún en presencia de concentraciones menores de la citocinina.

Ya en la fase de pretratamiento, (Figura 1), cuando los ápices fueron inoculados en los medios de precultivo por 24 h y luego transferidos al de regeneración para la evaluación de su respuesta durante las semanas posteriores al ensayo, la mayor sobrevivencia se observó con el tratamiento MS + 0,3 M sacarosa por 24 h, con 56% de sobrevivencia después de 4 semanas de cultivo. Le siguió el medio con 0,5 M de sacarosa (alrededor del 25% de sobrevivencia).

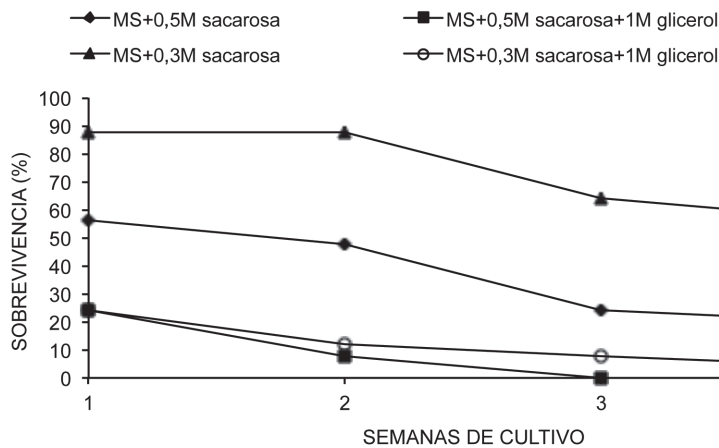


Fig. 1. Sobrevivencia de los ápices de cedro (*Cedrela odorata*) expuestos a diferentes medios de precultivo por 24 h, como pretratamiento antes del congelamiento en nitrógeno líquido posteriormente cultivados en medio de regeneración MS + 0,5 mg.l⁻¹ BAP por 4 semanas.

Al adicionar a dichos medios 1 M de glicerol se redujo drásticamente la sobrevivencia de los ápices, al llegar incluso, a un 0% a la cuarta semana de precultivo. La sobrevivencia y la regeneración se llevó a cabo con el cultivo en el medio MS+0,5 mg.l⁻¹ BAP y la regeneración se presentó en la semana 3 de cultivo. Según la tendencia anterior, el mayor porcentaje de regeneración de los ápices sobrevivientes al precultivo se presentó en aquellos precultivados en el medio con 0,3 M sacarosa (57%), seguido por el tratamiento de precultivo en 0,5 M sacarosa (20%). En los medios con glicerol, de los pocos ápices verdes observados antes de la cuarta semana de cultivo, ninguno llegó a regenerar. Con estos ensayos se logró establecer el mejor tratamiento de precultivo para poder continuar con los pasos siguientes del protocolo para la crioconservación.

Al evaluar el efecto de la incubación en las soluciones vitrificadoras PVS2, PVS3 y PVS4, durante 5 y 10 min, seguido del congelamiento en NL (Cuadro 1), se observó que los tratamientos que mostraron los mayores porcentajes de sobrevivencia, después de la primera semana de cultivo en el medio de recuperación fueron la incubación en PVS2 por 5 y 10 min, así como la

PVS3 y la PVS4 por 10 min, con porcentajes de sobrevivencia superiores al 90%; mientras que los ápices incubados en PVS3 y PVS4 durante 5 min presentaron valores inferiores al 80%. Esto evidencia que posterior al congelamiento el material logró sobrevivir y los tratamientos siguientes deben enfocarse en evitar que mueran y lleguen a regenerar en plántulas completas. Este comportamiento se invirtió al final de la segunda semana, ya que estos 2 últimos tratamientos, mostraron la mayor sobrevivencia, con 61 y 57% respectivamente. Por otro lado, con la incubación en PVS2 los porcentajes de sobrevivencia decrecieron notablemente en la segunda semana, donde los tratamientos con los menores porcentajes de sobrevivencia son de alrededor de 40%. Mediante un ANOVA se determinó que para la primera semana, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos NL+ (sometidos a NL). Sin embargo, los mejores resultados obtenidos a lo largo de la evaluación, bajo las condiciones de este ensayo (no sólo basados en datos cuantitativos sino también en la apariencia del material evaluado), se lograron al emplear la PVS3 por 5 min; donde la apariencia de los ápices fue notablemente la mejor.

Cuadro 1. Supervivencia de los ápices de cedro (*Cedrela odorata*) al congelamiento en nitrógeno líquido (NL) después de la incubación en las soluciones vitrificadoras PVS2, PVS3 y PVS4 por periodos de 5 y 10 min y cultivados en el medio MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ con papel filtro, por 2 semanas.

Solución vitrificadora	Sobrevivencia ápices crioconservados (% ± E. E.)*			
	Semana 1		Semana 2	
	Tratamiento	5 min	10 min	5 min
PVS 2	92,36±1,12	95,40±2,39	42,13±1,85	38,41±1,76
PVS 3	79,63±1,94	94,29±3,72	60,65±2,18	50,00±3,00
PVS 4	75,76±2,30	90,37±3,01	56,87±4,20	44,44±3,07

*Cada valor representa un valor promedio de 3 repeticiones con 10-12 ápices por repetición. E. E.= Error Estándar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ambos tiempos) dentro de la misma semana de evaluación al emplear las 3 soluciones vitrificadoras (p=0,05).

En el último ensayo de vitrificación (con las 4 soluciones basadas en MS con diferentes concentraciones de sacarosa y DMSO) (Cuadro 2), después de una semana de cultivo en el medio de recuperación, se observaron altos porcentajes de supervivencia de los ápices para ambos periodos evaluados, presentándose los mayores porcentajes para los tratamientos con 0,3 M sacarosa, 0,3 M sacarosa + 5% DMSO y 0,4 M sacarosa por 5 min (superior al 90%). En la segunda semana, el porcentaje de supervivencia para los tratamientos con 0,3 M sacarosa

y 0,3 M sacarosa + 5% DMSO durante 5 min, se mantuvo bastante alta (cerca del 86% y 80% respectivamente), sin embargo; en esta semana, la supervivencia disminuyó considerablemente para los ápices incubados en la solución con 0,4 M sacarosa + 5% DMSO por 5 y 10 min (40% y 23% respectivamente). El ANOVA mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos (99% de confianza), al ser el mejor tratamiento, la incubación en el medio con 0,3 M sacarosa por 5 min, antes del congelamiento en NL (93 y 86%, semana 1 y 2 respectivamente).

Cuadro 2. Supervivencia de los ápices de *Cedrela odorata* (cedro) al congelamiento en nitrógeno líquido (NL) utilizando 4 soluciones vitrificadoras con sacarosa y sacarosa + DMSO y 2 periodos de incubación, 5 y 10 min, previo al congelamiento. El medio de recuperación fue el MS + 1,0 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ + 0,01 mg.l⁻¹ AIA con papel, por 2 semanas.

Solución vitrificadora	Sobrevivencia ápices crioconservados (% ± E. E.)*			
	Semana 1		Semana 2	
	Tratamiento	5 min	10 min	5 min
MS + 0,3 M sacarosa	93,34±1,74 b ^l	83,96±2,36 c	85,60±1,82 a	63,96±2,63 bc
MS + 0,4 M sacarosa	75,60±3,92 d	92,86±2,81 b	53,57±2,53 d	67,62±2,53 b
MS + 0,3 M sacarosa + 5%DMSO	94,12±2,14 ab	81,09±4,57 cd	74,70±2,08 b	59,28±2,01 c
MS + 0,4 M sacarosa + 5%DMSO	96,66±1,55 a	54,54±3,88 e	41,66±1,36 e	22,50±2,63 f

*Cada valor representa un valor promedio de 3 repeticiones con 10-12 ápices por repetición. E. E.= Error Estándar.

¹Letras distintas indican diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia en todos los tratamientos, dentro de una misma semana de evaluación (p<0,05).

En los ensayos iniciales para la regeneración de los ápices sobrevivientes al congelamiento, al evaluar el efecto de varios medios de regeneración, después de la crioconservación con el uso de solución vitrificadora, el medio MS + 0,3 M de sacarosa mostró que el TDZ en cedro aún en bajas concentraciones, indujo la formación excesiva de callo. Por otra parte, el BAP, pero sobre todo la KIN dieron resultados satisfactorios (no ocurrió vitrificación ni formación de callos, se observó indicios de respuesta como la aparición de hojas nuevas en un 46% del material posterior a 21 días de cultivo). El uso de AG₃ en combinación con estas 2 últimas citocininas resultó en un mejor desarrollo de los ápices (57% de ellos se mantuvieron vivos, con hojas nuevas a los 21 días y aumento en su tamaño). Según las pruebas estadísticas empleadas en este estudio, no hubo diferencia significativa entre los resultados, sin embargo; de manera cualitativa se observó mejor coloración, tamaño y número de las hojas, niveles de oxidación (resultados no se muestran) en la recuperación al usar el M2 (MS + 1 mg.l⁻¹ KIN + 0,5 mg.l⁻¹ AG₃ + 100 mg.l⁻¹ carbón activado) con respecto al medio denominado M1 (MS + 1 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ AG₃ + 0,01 mg.l⁻¹ AIA + 100 mg.l⁻¹ carbón activado).

Crioconservación de semillas

Las semillas provenientes de campo (Santa Cruz, Guanacaste), que presentaron un contenido de humedad alrededor de 7,9% mostraron los mayores porcentajes de germinación que variaron del 97% al 100%, tanto las semillas control sin congelar, como las congeladas. Lo que indica que la metodología utilizada para la crioconservación de cedro es efectiva. El porcentaje de germinación de las semillas congeladas después de la desinfección y congeladas antes de la desinfección no mostró diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, aquellas semillas desinfectadas después del congelamiento presentaron mayor vigorosidad y coloración verde más intensa que las desinfectadas antes del congelamiento en NL (Datos no se muestran).

Cuando las semillas provenientes del BSF fueron congeladas y almacenadas en NL por varios periodos, se observó que la duración del almacenamiento no tuvo gran efecto negativo sobre su capacidad de germinación (Cuadro 3). La evaluación de los resultados se realizó semanalmente hasta la 5 semana después de la descongelación y el cultivo en el medio de regeneración, ya que conforme aumentó el tiempo

Cuadro 3. Germinación de semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) después de la congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (NL) durante varios periodos.

Tiempo de almacenamiento en NL	Germinación de semillas (% ± E. E.)*		
	Semanas de cultivo		
	1	3	5
Control sin congelar	93,71±3,08	100,00±0,00	100,00±0,00
1 h	92,30±6,85	100,00±0,00	100,00±0,00
24 h	85,25±8,38	100,00±0,00	100,00±0,00
7 días	92,85±7,75	100,00±0,00	100,00±0,00
1 mes	83,62±11,62	95,60±1,52	96,20±0,91
3 meses	86,88±8,10	94,48±1,89	94,92±2,60
6 meses	84,66±7,93	92,80±3,49	94,60±2,71

*Cada valor representa un valor promedio de 3 repeticiones con 30 semillas por repetición. E. E.= Error Estándar. El ensayo se repitió 2 veces. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p=0,05).

de almacenamiento, el tiempo requerido para la germinación de las semillas se incrementó (en promedio 2 días más, esto respecto al inicio de la germinación al darse ruptura de la semilla y visualización de la raíz [datos no se muestran]) aunque al cabo de los 7 días de su cultivo (primera evaluación) la mayoría había germinado en todos los casos. Así, el análisis de varianza mostró que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, sin embargo; cabe resaltar que el ensayo se realizó en 2 ocasiones con 2 lotes de semillas diferentes. En ambos casos el comportamiento de las plántulas regeneradas a partir de las semillas fue similar, pero la germinación de las semillas procedentes del segundo lote resultó menor, pero hay que considerar que para estas se reportó un porcentaje de germinación de tan solo 60% antes de la selección de las semillas por color, por lo que ya de previo era de esperar un resultado inferior de este parámetro. Esto evidenció la necesidad de utilizar material de partida de calidad para garantizar el éxito de los resultados.

DISCUSIÓN

Los altos porcentajes de germinación de las semillas y la apariencia vigorosa de las plántulas generadas demostraron que el medio empleado fue el adecuado. El empleo de un medio sencillo (sin reguladores) permitió la germinación de las semillas de cedro, ya que el endospermo provee al embrión de los nutrientes y reguladores de crecimiento requeridos para su germinación y desarrollo inicial (Flores-Vindas 1999). Para el desarrollo posterior y la multiplicación de las plántulas por microestacas, segmentos de tallo con 1 o 2 brotes, el uso de citocininas tampoco fue indispensable. Durante esta etapa, se obtuvieron buenos resultados en el mismo medio de cultivo (MS) y con la adición de caseína hidrolizada, se evitó el amarillamiento y caída de las hojas. Se menciona que en muchos medios para el establecimiento y multiplicación in vitro se utilizan citocininas (Reyes y Vera 2004), pero algunas especies no lo requieren, como es el caso

de algunas especies maderables durante la etapa de elongación y multiplicación (Abdelnour et ál. 2011, Gamboa y Abdelnour 1999) y el cedro en esta investigación. A la vez se menciona que la caseína hidrolizada ayuda a promover la activación de yemas y el crecimiento de las plantas cultivadas in vitro, como resultado de suministrar extra calcio, fósforo y micronutrientes y se menciona que es fuente importante de nitrógeno reducido en forma de aminoácidos, lo que parece explicar la apariencia verde y vigorosa de las plantas durante la multiplicación (George et ál. 2008, Reyes y Vera 2004, Pérez et ál. 2001).

Por otra parte, el BAP en concentraciones mayores a $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ afectó negativamente el material vegetal de cedro (caída de hojas e hiperhidratación). Al igual que en este estudio, Pérez et ál. (2001), encontraron que las bajas concentraciones de BAP fueron más eficaces para promover la brotación de los explantes nodales de esta especie. Adicionalmente, Collado et ál. (2004), informaron sobre un efecto similar del BA en bajas concentraciones ($0,25 \text{ mg.l}^{-1}$ ó $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$), para la elongación de las plántulas de caoba (*Swietenia macrophylla* King) provenientes de semillas germinadas in vitro. Se han planteado numerosas hipótesis dirigidas a explicar la causa de las alteraciones generadas por la hiperhidratación de brotes, fenómeno descrito como un desorden fisiológico caracterizado por la apariencia vidriosa e hinchada de los tejidos, tallos turgentes y órganos translúcidos y quebradizos y una de las razones que se mencionan es la presencia de altas concentraciones de reguladores de crecimiento como BAP, ABA, AIA en el medio de cultivo (Sánchez y Jiménez 2010, Afanador 2005).

En el presente estudio, dado el efecto de hiperhidricidad provocado por altas concentraciones de BAP en el cedro, en la etapa de recuperación y regeneración de ápices fue un punto importante a considerar. Sin embargo, la adición de citocininas y otros reguladores del crecimiento fue indispensable para la regeneración de los ápices congelados en NL. El medio de cultivo empleado inicialmente para la regeneración de los ápices, suplementado con $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ BAP, no

fue tan efectivo como cuando se adicionó 1,0 mg.l⁻¹ BAP, el cual mejoró considerablemente la respuesta de los explantes. Usualmente en los meristemas y ápices la citocinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces y las exporta hacia los brotes, donde se promueve su desarrollo; por lo que la adición exógena de citoquinina en los medios de establecimiento y regeneración de ápices es generalizada (Collado et ál. 2004, Navarro et ál. 2002).

La implementación de papel filtro sobre el medio sólido fue un factor que mejoró la sobrevivencia y regeneración de los ápices en este estudio. Tanto las altas concentraciones de sacarosa, como las soluciones vitrificadoras son tóxicas para las células si el tiempo de exposición se prolonga más allá de un límite (González y Engelmann 2006). El papel filtro posiblemente facilitó el drenaje de estas sustancias hacia el medio y disminuyó la exposición directa de los ápices a las mismas durante los primeros días de cultivo, críticos para su sobrevivencia; además facilitó la manipulación de los ápices durante las transferencia a medio fresco y la evaluación visual al crear un mejor contraste.

El precultivo de los ápices representa un periodo de acondicionamiento para la exposición tanto a los crioprotectores, como al NL. El precultivo de los ápices con medios enriquecidos con sacarosa antes de continuar con la deshidratación con las sustancias crioprotectoras y vitrificadoras, ha resultado ser efectivo para mejorar la sobrevivencia post-almacenamiento en algunas especies. Esto debido a que la acumulación de azúcares no solo incrementa la deshidratación protectora de los tejidos a congelar y la concentración interna de solutos, sino que también incrementa la estabilidad de las membranas bajo condiciones severas de deshidratación (Tagaki 2000). En general, el precultivo con altas concentraciones de sacarosa, sola o en combinación con DMSO y glicerol en el medio de cultivo se recomienda para la crioconservación de ápices de muchas especies (Sakai y Engelmann 2007). En el presente ensayo se encontró que, efectivamente tratamientos de este tipo fueron necesarios para

lograr el éxito en la sobrevivencia de los ápices, posterior al congelamiento en NL, también se observó que concentraciones altas de sacarosa resultaron dañinas para los explantes; al ser una concentración relativamente baja de sacarosa (0,3 M) la que permitió la mayor sobrevivencia y regeneración de los ápices después del congelamiento.

De las soluciones vitrificadoras evaluadas en este estudio, la PVS3 permitió los mayores porcentajes de sobrevivencia al NL al final del periodo de evaluación. La solución vitrificadora PVS4 mantuvo porcentajes intermedios, mientras que cuando se utilizó PVS2, la sobrevivencia de los ápices mostró los menores valores. Es importante resaltar que la solución PVS3 contiene únicamente sacarosa y glicerol, mientras que las otras 2 soluciones vitrificadoras contienen adicionalmente DMSO y etilenglicol, compuestos que al parece fueron más tóxicos para los ápices de cedro. De acuerdo con Sánchez y Jiménez (2010), estas soluciones vitrificadoras son mezclas de sustancias en altas concentraciones y pueden causar plasmólisis excesiva y choque osmótico, lo que resulta en efectos negativos sobre el tejido, ya que provoca daños después de la descongelación y durante la regeneración. Este último comportamiento fue observado principalmente para la solución PVS2. Esto puede deberse a algunos de los crioprotectores como el DMSO, se utilizan porque pueden penetrar al interior de las células y por ende proteger su integridad durante la congelación (Rivera et ál. 2008), pero también pueden ser tóxicos para algunas especies tropicales, por lo que, tanto los crioprotectores como sus combinaciones deben ser seleccionados cuidadosamente (Sánchez y Jiménez 2010). La PVS3 mostró los mejores resultados en la sobrevivencia y regeneración de los ápices de cedro, lo que coincide con los resultados obtenidos por Wu et ál. 2000 que encontraron que el factor crítico para el empleo de la técnica de vitrificación, fue la escogencia de la solución vitrificadora y que solo la PVS3 permitió la sobrevivencia en todos los cultivos evaluados.

Los resultados más prometedores para la crioconservación de ápices de cedro se

presentaron con el precultivo en 0,3 M sacarosa y la incubación, durante pocos minutos (5 a 10 min) en una solución con sacarosa y bajas concentraciones de DMSO (5%), antes del congelamiento en NL. Estos resultados muestran de nuevo el comportamiento típico del DMSO en este estudio. Además, no se empleó la solución de lavado (LS) ya que la concentración de sacarosa de esta es mucho mayor que la contenida en las soluciones empleadas. Wu et ál. (2000), mencionan un estudio en el que al crioconservar ápices de manzana, la duración del precultivo y el pretratamiento tuvieron influencia en el porcentaje de sobrevivencia; sin embargo, al lavar los explantes con una solución 1,2 M sacarosa después del descongelamiento, no se incrementó la sobrevivencia, en contraste con lo que es observado en la mayoría de las especies. Como menciona Takagi (2000), si aún con el uso de químicos tóxicos como el DMSO un tejido permanece viable, el rápido desarrollo de soluciones vitrificadoras menos tóxicas puede promover la más amplia aplicación de estas técnicas de crioconservación.

Un aspecto importante en todas las pruebas fue la incubación de los ápices en las soluciones en frío (baño de hielo). Takagi (2000) registra efectos positivos del uso de bajas temperaturas, (0°C), durante la deshidratación con las soluciones vitrificadoras. Esto ha sido muy efectivo con especies tropicales, que son relativamente susceptibles a los procesos de deshidratación. Se menciona que en *Dioscorea alata*, la sobrevivencia post-tratamiento fue drásticamente mejorada de un 47 a 91% por disminución de la temperatura de 25 a 0°C durante la deshidratación con PVS2.

Los resultados observados en estos ensayos se consideran valiosos ya que reflejan el efecto más inmediato de cada tratamiento sobre la sobrevivencia de los ápices, que aunque varió de diversas formas con el tiempo, constituyen un importante punto de partida para continuar con la implementación de cambios en las condiciones de cultivo post-congelamiento que ayuden eventualmente a tratar de mantener los altos porcentajes de sobrevivencia logrados después del NL y buscar fomentar su regeneración.

La crioconservación efectiva de semillas se ha podido comprobar en un gran número de especies (Abdelnour et ál. 2007, Iriondo 2001) y son las semillas pequeñas, (ortodoxas) las que mejor se adaptan a esta técnica, mientras que las especies con semillas grandes y con alto contenido en lípidos son las más problemáticas (recalcitrantes). También se ha demostrado que si las semillas presentan contenidos de humedad entre 4 y 12% al momento de la cosecha, estas pueden ser almacenadas directamente en NL, sin necesidad de desecación previa ni de un enfriamiento gradual, pero cuando es alto resulta necesaria la desecación previa, ya que el contenido de humedad de las semillas es uno de los factores más importantes para que sean capaces de sobrevivir a la congelación (Iriondo 2001). En el presente estudio, no se observaron diferencias estadísticas entre la sobrevivencia de los controles y las semillas congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido durante los diferentes periodos evaluados, resultados similares a los obtenidos por Cardoso y colaboradores en semillas de especies leguminosas (Cardoso et ál. 2000). La sencillez y practicidad de la metodología para la crioconservación de semillas ortodoxas la hacen un complemento interesante para los bancos de semillas convencionales, principalmente para muestras de las que no se dispone de gran cantidad de semilla.

En este estudio, la técnica de vitrificación para la crioconservación de ápices de cedro se mostró muy prometedora, ya que permitió altos porcentajes de sobrevivencia y regeneración, especialmente cuando se utilizaron soluciones crioprotectoras en bajas concentraciones y por periodos cortos de incubación antes del congelamiento en nitrógeno líquido. Así mismo, el estudio mostró que la congelación y almacenamiento de semillas de cedro en NL es altamente recomendado.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (MICIT/CONICIT) y a la

Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) por el apoyo financiero para desarrollar esta investigación. A los estudiantes Ingrid Méndez y Julio Chaves por su valiosa asistencia.

LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR A., AGUILAR M., VALVERDE L. 2011. Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchorroides*). Agronomía Costarricense 32:9-19.
- ABDELNOUR A., ROJAS G., ALFARO U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. Tecnología en Marcha 20:1-6.
- AFANADOR A.M. 2005. Propagación in vitro a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L., (clavel). Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 54 p.
- BENSON E., JOHNSTON J., MUTHUSAMY J., HARDING K. 2006. Physycal and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation. Plant Tissue Culture Engineering 5:441-476.
- CARDOSO F., PITA J.M., PALMEIRA J. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Campiña Grande. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais 2:67-71.
- COLLADO R., BARBÓN R., AGRAMONTE D., JIMÉNEZ F., PÉREZ M., GUTIÉRREZ O., RAMÍREZ D. 2004. Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología Vegetal 4:143-146.
- DÍAZ A., BRENES C., CASCANTE D., OVARES C. 2010. Plagas y enfermedades forestales en cedro amargo (*Cedrela odorata*). Escuela de Ciencias Ambientales. Universidad Nacional de Costa Rica, pp. 3, 8, 13.
- DOLCE N., SCOCCHI A., MROGINSKI L. 2004. Crioconservación de ápices de *Citrus sinensis*. IBONE, Argentina. FACENA 20:37-41.
- ENGELMANN F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, pp. 8-20. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Rome, Italy.
- ENGELMANN F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 47:5-16.
- FLORES E. 1999. La Planta: estructura y función, pp. 663-735. Vol. II. Libro Universitario Regional. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- GAMBOA J.P., ABDELNOUR A. 1999. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). Agronomía Costarricense 23:69-76.
- GARCÍA L., DE FERIA M., ACOSTA K. 2007. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. Cuba. Biotecnología Vegetal 7:67-79.
- GEORGE E., HALL M.A., DE KLERK G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. 3 ed. Springer. pp. 2-3.
- GONZALEZ M.T., ENGELMANN F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. Cryo-Letters 27:155-168.
- HOWARD F., MERIDA M. 2004. *Hypsipyla grandella* (Zeller). Universidad de Florida. Consultado el 24 de enero del 2010. Disponible en http://entnem.ifas.ufl.edu/creatures/trees/moths/mahogany_borer-spanish.htm
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 2008. International Ruler For Seed Testing: The germination test. Seed Science and Technology. 7 p.
- IRIONDO J.M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). Universidad Politécnica de Madrid. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 16:5-24.
- MARTÍNEZ R., AZPIROZ H., RODRÍGUEZ J., CETINA M., GUTIÉRREZ M. 2003. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. Revista Chapingo 9:3-5.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. Physiol Plant 15:473-497.
- NAVARRO C. 2002. Genetic resources of *Cedrela odorata* L., and their efficient use in Mesoamerica. Universidad de Helsinki. Helsinki, Finlandia, p. 7.
- PÉREZ J., MESÉN F., HILJE L., AGUILAR M.E. 2001. Desarrollo de un método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* L. Optimización de la fase de multiplicación. CATIE. Turrialba, Costa Rica. Revista Forestal Centroamericana 38:67-71.
- POEHLMAN J. 2005. Mejoramiento genético de las cosechas. Limusa. México, p. 257.
- REYES X., VERA J. 2004. Efecto de reguladores de crecimiento en las diferentes fases de la propagación in vitro de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). UTEQ. Los Ríos, Ecuador. 10 p.
- RIVERA A.L., VALBUENA B., HIDALGO R., MORENO J.D. 2008. Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* mediante desecado de tejidos. Colombia. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 9:37-38.
- SAKAI A., ENGELMANN F. 2007. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A Review. Cryo-letters 28:151-172.
- SÁNCHEZ N., JIMÉNEZ V.M. 2010. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de

- bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Universidad de Costa Rica. Revista Agronomía Mesoamericana 21:196-198.
- TAKAGI H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species, pp. 178-191. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds.). Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application. IPGRI, Rome, Italy.
- WADSWORTH F. 2000. Producción Forestal para América Tropical. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Washington, DC, US. 628 p.
- WANG Z., DENG X. 2004. Cryopreservation of shoot tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. Cryo-Letters 25:51-58.
- WU Y., ENGELMANN F., ZHAO Y. 2000. Cryopreservation of apple in vitro germplasm in China, p. 474. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds.). Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application. IPGRI, Rome, Italy.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr